

09/380638

510 Rec'd PCT/PTO 07 SEP 1999

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP98/00945 is a true and complete translation of the above identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 30th day of July, 1999

Full name of the translator: Tadahiko KURITA

Signature of the translator:



Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,  
New Otemachi Bldg., 2-1,  
Otemachi 2-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo, JAPAN

09/380638

PCT/JP98/00945

日本特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

09.03.98

REC'D	JUN 15 1998
WIPO	WPO

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 1997年 3月 7日

出願番号  
Application Number: 平成 9年特許願第053409号

出願人  
Applicant(s): 今西 武

PRIORITY DOCUMENT

1998年 4月 17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3029439

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013228

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

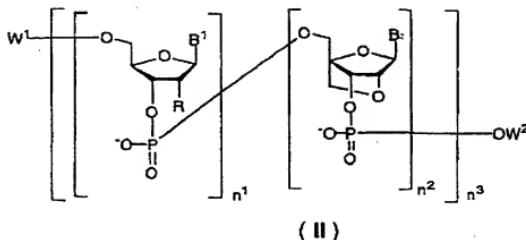
【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

表される構造を1または2以上有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類縁体。

## 【請求項5】 一般式 (II)

## 【化3】



[式中、 $B^1$ 、 $B$ は同一または異なり、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、 $R$ は水素、水酸基、ハロゲン、またはアルコキシ基であり、 $W^1$ 、 $W^2$ は同一または異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アシル基、シリル基またはリン酸残基もしくはリン酸ジエステル結合を介した天然型ヌクレオシド、及びその類縁体またはこれらヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり、 $n^1$ または $n^2$ は同一または異なり、0から50の整数である（ただし、 $n^1$ または $n^2$ が同時にゼロになることはない。また $n^2$ のすべてがゼロになることはない。）、 $n^3$ は1～50の整数である、ただし、 $n^1$ および/または $n^2$ が2以上の場合には $B^1$ と $B$ は同一でなくてもよく、 $R$ も同一でなくてもよい]で表されるオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド類縁体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【産業上の利用分野】

本発明は新規なヌクレオシド類縁体とヌクレオチド類縁体に関し、更に詳細にはアンチセンス分子に適したヌクレオチド類縁体に関するものである。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

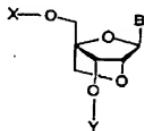
本発明の発明者らは、アンチセンス法において有用と考えられる、核酸における糖部のコンホメーションの固定化を施したした核酸類縁体を設計し、その単位構造となるヌクレオシド類縁体の合成を行い、これを用いて調製したオリゴヌクレオチド類縁体にアンチセンス分子として極めて有用であることを確認した。以下に本発明の詳細を説明する。

## 【0007】

本発明のヌクレオシド類縁体の構造は下記の一般式（I）で表すことができる

## 【0008】

## 【化4】



(I)

〔式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、X及びYは同一もしくは異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アシル基、又はシリル基である〕で表わされるヌクレオシド類縁体もしくはそれらのアミダイト誘導体である。

## 【0009】

アルキル基とは炭素数1—20の直鎖または分枝鎖状のアルキル基を示し、例えば、メチル基、エチル基、n—ブロビル基、i—ブロビル基、n—ブチル基、t—ブチル基、ベンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等があげられる。

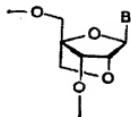
## 【0010】

アルケニル基とは、炭素数2—20の直鎖または分枝鎖状のアルケニル基を示

【0015】

また、本発明のヌクレオチド類縁体は、一般式 (Ia)

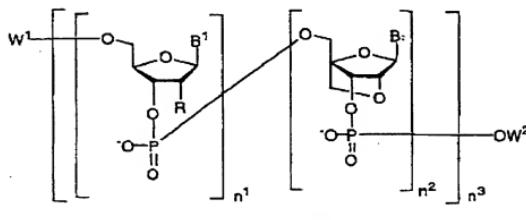
【化5】



(Ia)

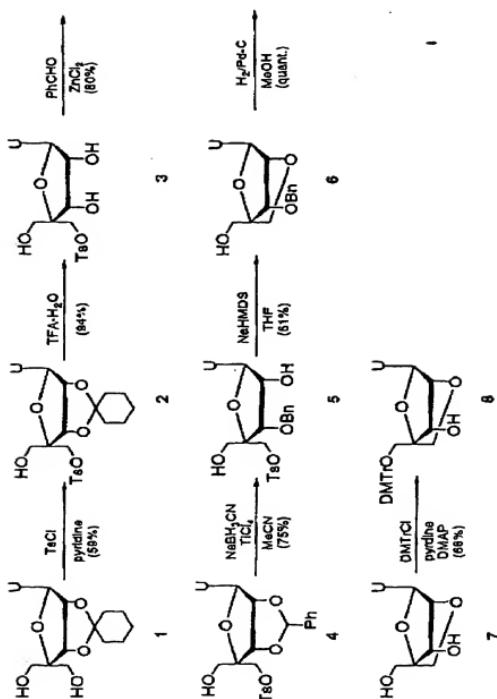
[式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である]で表される構造を1または2以上有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類縁体、または、一般式 (II)

【化6】



(II)

[式中、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>は同一または異なり、ピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体であり、Rは水素、水酸基、ハロゲン、またはアルコキシ基であり、W<sup>1</sup>、W<sup>2</sup>は同一または異なり、水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アシリル基、シリル基またはリン酸残基もしくはリン酸ジエステル結合を介した天然型ヌクレオシド、合成ヌクレオシドまたはこれらヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドである、n<sup>1</sup>またはn<sup>2</sup>は同一または異なり、0～50の整数である（ただし、n<sup>1</sup>またはn<sup>2</sup>が同時にゼロになることはない。また、n<sup>2</sup>の全てが同時にゼロになることはない。）、n<sup>3</sup>は1～50の整数である、ただし、n<sup>1</sup>および/またはn<sup>2</sup>



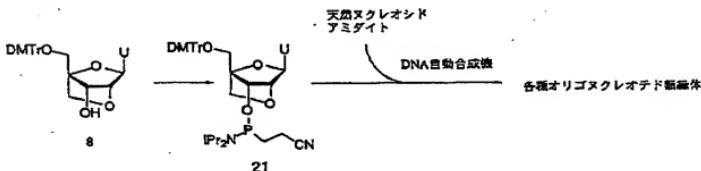
ウリジンから文献 [ J. A. Sechrist et al., J. Am. Chem. Soc., 101, 1554 (1979); G. H. Jones et al., J. Org. Chem., 44, 1309 (1979) ] に従い合成した化合物 1 をトシリクロリド (T s C 1) で 2 個ある第一級アルコールの一方のみをトシリ化して化合物 2 に導き、酸加水分解してトリオール体 3 とした。化合物 3 はベンズアルデヒドと酸触媒下で縮合反応を行いベンジリデン化合物 4 として、このものを四塩化チタン (T i C 1<sub>4</sub>) 存在下にナトリウムシアノボロヒドリド (N a B H<sub>3</sub>C N) で還元すると化合物 5 が得られた。本化合物をテトラヒドロフラン (T H F) 中でナトリウムヘキサメチルジシラジド (N a H M D S) と反応させたところ、ビシクロ化合物 6 (化合物 I : B = ウラシル (U), X

環反応すると、目的のメチルグリコシル化合物17が得られた。本化合物の1位OMe基を天然の様々な核酸塩基や非天然の核酸塩基類縁体に置換するには、既に開発された種々の方法により可能である。例えば、下式化合物17から化合物20のような方法が使用できる。

(2) オリゴヌクレオチド類縁体の合成化合物 8 に 2-シアノエチル-N, N', N' -テトライソプロピルホスホロアミダイトを作用させ、アミダイト体 16 を得、このものと天然ヌクレオシドアミダイト体とを組み合わせて、DNA 自動合成機を用いて種々のオリゴヌクレオチド類縁体を合成する。合成した粗生成物はオリゴパック、逆相クロマトカラムを用いて精製し、精製物の純度を HPLC で分析することにより確認する。

## 【0023】

## 【化10】



化合物 8 のモノマーユニットは、オリゴヌクレオチド類縁体の中に 1 つ以上存在させることができる。また、オリゴヌクレオチド類縁体の中の 2 ケ所以上の位置に、1 または 2 以上の天然ヌクレオチドを介して隔離された状態で存在させても良い。本発明に依れば、本発明のヌクレオチド類縁体（ヌクレオシド類縁体）を必要な位置に必要な数（長さ）で導入したアンチセンス分子を合成することができる。オリゴヌクレオチド類縁体全体の長さとしてヌクレオシド単位が 2~50、好ましくは 10~30 個である。

## 【0024】

このようなオリゴヌクレオチド類縁体（アンチセンス分子）は、各種ヌクレアーゼに対して分解されにくく、生体への投与後、長時間生体内に存在することができる。そして、例えば、メッセンジャー RNA と安定な二重鎖を形成して病因となるタンパク質の合成を阻害したり、ゲノム中の二重鎖 DNA との間で三重鎖を形成して、メッセンジャー RNA への転写を阻害する。また、感染したウイルスの増殖を抑えることも可能となる。

## 【0025】

これらのことから、本発明のヌクレオシド類縁体を用いたオリゴヌクレオチド

.20 (2H, ABq,  $J = 11$  Hz), 4.92 (1H, d,  $J' = 6$  Hz), 5.05, 5.06 (1H, dd,  $J = 4, 6$  Hz), 5.60 (1H, d,  $J = 7$  Hz), 5.75 (1H, d,  $J = 4$  Hz), 7.48 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7.77 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 7.81 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 10.10 (1H, s, ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -acetone):  $\delta$  21.5, 24.1, 24.5, 25.5, 34.8, 36.9, 63.5, 69.7, 82.5, 84.7, 87.8, 92.9, 102.9, 115.4, 128.8, 130.8, 133.9, 142.7, 145.9, 151.3, 163.5. Mass (EI):  $m/z$  481 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ).

Anal. Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9\text{S} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$ : C, 53.69; H, 5.61; N, 5.44; S, 6.22. Found: C, 53.99; H, 5.48; N, 5.42; S, 6.10.

(2) 4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)ウリジン(3)の合成

化合物2 (107 mg, 0.21 mmol)をTFA-H<sub>2</sub>O (98:2, 1 ml) 中室温で10分間攪拌した。反応溶液を減圧留去し、EtOHを加えて3回共沸した。得られた粗成体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1) により精製し、化合物3 (85.0 mg, 0.20 mmol, 94%)を得た。

【0031】

化合物3: 白色粉末 mp 119-120 °C. IR  $\nu$  (KBr): 3227, 3060, 2932, 2837, 1709, 1508, 1464, 1252, 978, 835, 763, 556  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -acetone):  $\delta$  2.31 (3H, s), 2.84 (3H, s), 3.71 (2H, s), 4.13, 4.20 (2H, ABq,  $J = 11$  Hz), 4.28, 4.31 (1H, dd,  $J' = 9, 6$  Hz), 4.36 (1H, d,  $J' = 6$  Hz), 5.54 (1H, d,  $J' = 8$  Hz), 5.75 (1H, d,  $J = 7$  Hz), 7.32 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7.67 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7.70 (1H, d,  $J' = 8$  Hz), 10.14 (1H, s).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{d}_6$ -acetone):  $\delta$  21.5, 63.7, 70.8, 72.7, 74.6, 86.8, 88.8, 103.1, 128.8, 130.7, 133.9, 141.7, 145.8, 151.8, 163.9. Mass (EI):  $m/z$  256 ( $\text{M}^+ - \text{OTs}$ ).

(3) 2',3'-O-ベンジリデン-4'-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)

ウリジン(4)の合成

窒素気流下、化合物3 (400 mg, 0.93 mmol) にベンズアルデヒド (2.4 ml,

excess)、塩化亜鉛 (670 mg, 5.0 mmol) を加え室温にて5時間攪拌した。反応を飽和重曹水により止め、クロロホルムで抽出し、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒留去後シリカゲルカラム

4-7.29 (7H, m), 7.48 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 7.70 (2H, d,  $J = 9$  Hz), 9.91 (1H, s).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  21.6, 63.2, 69.2, 73.6, 74.6, 78.1, 86.6, 92.9, 102.5, 127.9, 128.2, 128.3, 128.6, 129.9, 132.3, 136.9, 142.4, 145.2, 150.7, 163.8.

Anal. Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$ : C, 55.59; H, 5.05; N, 5.40; S, 6.18.

Found: C, 55.41; H, 5.02; N, 5.32; S, 6.15.

(5) 3'-O-ベンジル-2'-O-, 4'-メタノウリジン (6) の合成

窒素気流下、化合物 5 (80 mg, 0.16 mmol) の無水 THF 溶液 (1.5 ml) に室温で NaHMDS (3.2 mmol) の無水ベンゼン懸濁液 (0.7 ml) を加え、室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加え、 $\text{CHCl}_3$  にて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 10:1) にて精製後、MeOH にて再結晶し、化合物 6 (41 mg, 0.10 mmol, 61%) を得た。

【0034】

化合物 6: 無色結晶。mp 217-219 °C (MeOH).  $[\alpha]_D^{23} +108.4^\circ$  ( $c = 0.3$ , MeOH). IR  $\nu$  (KBr): 3059, 2951, 1688, 1459, 1271, 1053  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$ : 3.75, 3.85 (2H, AB,  $J = 8$  Hz), 3.77 (2H, d,  $J = 5$  Hz), 3.92 (1H, s), 4.44 (1H, s), 4.60 (2H, s), 5.39 (1H, t,  $J = 5$  Hz), 5.48 (1H, s), 7.31 (5H, m), 7.72 (1H, d,  $J = 8$  Hz), 11.37 (1H, s).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO):  $\delta$  56.0, 71.1, 71.6, 75.8, 76.5, 86.5, 88.3, 100.9, 127.4, 127.6, 128.2, 137.9, 139.0, 150.0, 163.3. Mass(EI):  $m/z$  346 ( $\text{M}^+$ , 1.1).

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ : C, 58.96; H, 5.24; N, 8.09.

Found: C, 58.67; H, 5.23; N, 8.05.

(6) 2'-O-, 4'-メタノウリジン (7) の合成

化合物 6 (25 mg, 0.072 mmol) のメタノール溶液 (2.5 ml) に 10% Pd-C (25 mg) を加え、水素気流下、常圧にて 15 時間攪拌した。反応液を濾過し、溶媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 10:1 then 5:1) にて精製し、7 (18.3 mg, quant.) を得た。

88ml, 18.8mmol)を加え、室温で13時間搅拌した。反応溶液に饱和重曹水を加えた後、AcOEtで3回抽出した。有機層を饱和食塩水で1回洗净後、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>にて乾燥した。溶媒を減压留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:AcOEt=5:1)により精製し、無色油状物質14(2.82g, 5.98mmol, 70%)を得た。

## 【0037】

[\alpha]<sub>D</sub><sup>17</sup>-16.2° (c=0.52, CHCl<sub>3</sub>) IR ν (KBr): 3510, 3061, 2938, 2852, 1465, 110

3

cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.09(9H, s), 1.28(3H, s), 1.49(3H, s), 3.22(3H, s), 3.67, 3.76(2H, AB, J=11Hz), 3.88, 3.93(2H, AB, J=11Hz), 4.49(1H, d, J=6Hz),

4.57(1H, d, J=6Hz), 4.93(1H, s), 7.38-7.43(6H, m), 7.67(4H, d, J=7Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub>: 19.2, 24.4, 25.9, 26.9, 55.0, 62.9, 64.8,

82.2, 85.9, 88.7, 108.6, 112.6, 127.8, 129.9, 133.0, 135.7.

Anal. Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>Si · 1/4 H<sub>2</sub>O: C, 65.45; H, 7.71. Found: C, 65.43; H, 7.59.

(2) メチル=5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-2', 3'-O-イソプロピリデン-4'-O-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)-β-リボフラノシド(15)の合成

窒素気流下、化合物(2.13g, 4.51mmol)の無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液(15ml)に室温でEt<sub>3</sub>N

(3.92g, 28.0mmol)、p-トルエンスルホニルクロリド(1.34g, 7.22mmol)、4-ジメチルアミノビリジン(90mg, 0.72mmol)を加え、室温で17時間搅拌した。反応溶液に饱和重曹水を加えた後、AcOEtで3回抽出した。有機層を饱和食塩水で1回洗净後、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>にて乾燥した。溶媒を減压留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:AcOEt=10:1)により精製し、無色油状物質15(2.76g, 4.42mmol, 98%)を得た。

3.

(4) メチル=5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-2'-O, 4'-メタノ-β-D-リボフラノシド(17)及び  
メチル5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-3'-O, 4'-メタノ-β-D-リボフラノシド(18)の合成

窒素気流下、化合物16(194mg, 0.33mmol)の無水THF溶液(4ml)に室温で

NaHMDS(3.30mmol)のbenzene懸濁液(1.6ml)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液に飽和重曹水を加えた後、反応溶媒を留去し、AcOEtで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄後、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>にて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:AcOEt=5:1)により精製し、無色油状物質17(48mg, 0.116mmol, 35%)及び無色油状物質18(59mg, 0.142mmol, 43%)を得た。

## 【0040】

化合物17: IR  $\nu$  (KBr): 3438, 3064, 1103, 1036 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.08(9H, s), 2.04(1H, br s), 3.39(3H, s), 3.65, 3.98(2H, AB, J=8Hz), 3.95, 4.02(2H, AB, J=12Hz), 4.02(1H, s), 4.30(1H, s), 4.79(1H, s), 7.38-7.46(6H, m), 7.65-7.69(4H, m).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ <sub>c</sub>: 19.2, 26.7, 55.0, 60.7, 71.2, 73.1, 79.9, 85.5, 104.3, 127.8, 129.9, 130.0, 132.9, 135.6, 135.7.

Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Si·1/4H<sub>2</sub>O: C, 65.68; H, 7.34. Found: C, 65.98; H, 7.23.

化合物18: IR  $\nu$  (KBr): 3456, 3058, 2938, 2852, 1467, 1108 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.10(9H, s), 3.26(3H, s), 3.71(2H, s), 4.02(1H, d, J=6Hz), 4.35, 4.95(2H, d, J=7Hz), 5.01(1H, s), 5.11(1H, d, J=6Hz), 7.38-7.44(6H, m), 7.66(4H, d, J=7Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ <sub>c</sub>: 19.3, 26.8, 55.4, 63.7, 75.1, 77.9, 84.5, 86.3, 111.9, 127.8, 128.0, 129.9, 132.9, 133.0, 135.6, 135.8, 135.9.

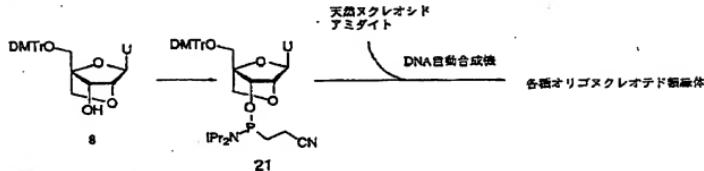
Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>Si·1/4H<sub>2</sub>O: C, 65.91; H, 7.34. Found: C, 66.07; H, 7.14.

(5) メチル=3'-O-アセチル-5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル

1H, s), 7.40-7.46(6H, m), 7.60(4H, d,  $J=6$ Hz), 7.66(1H, s), 9.68(1H, br s).

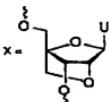
実施例3：オリゴヌクレオチド類縁体の合成

【化11】



【化12】

5'-GCGXTTTTGCT-3' (X<sub>1</sub>T<sub>6</sub>)  
 5'-GCGTTXTTTGCT-3' (T<sub>2</sub>X<sub>3</sub>T<sub>2</sub>)  
 5'-GCGTTXTTGCT-3' (T<sub>3</sub>X<sub>2</sub>T<sub>2</sub>)  
 5'-GCGTTTTXGCT-3' (T<sub>5</sub>X)  
 5'-GCGXXTTTGCT-3' (X<sub>2</sub>T<sub>4</sub>)  
 5'-GCGTTXTTGCT-3' (T<sub>2</sub>X<sub>2</sub>T<sub>2</sub>)  
 5'-GCGTTTTXGCT-3' (T<sub>4</sub>X<sub>2</sub>)  
 5'-GCGXXXXXGCT-3' (X<sub>6</sub>)  
 5'-GTTTTTTTXXC-3' (X<sub>2</sub>C)



(1) 3'-O-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ]-

5'-O-(4',4'-ジメトキシトリチル)-2'-O, 4'-メタノ

ウリジン(21)の合成

化合物8 (200 mg, 0.31 mmol)、ジイソプロピルアンモニウム テトラゾリド (39.6 mg, 0.23 mmol)を無水  $\text{CH}_3\text{CN}$  で3回共沸した後、無水  $\text{CH}_3\text{CN}$  - 無水 T H F 溶液 (3:1, 4 ml)とし、窒素気流下 2-シアノエチル  $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -テトライソプロピル ホスホジアミダイト (0.12 ml, 0.37 mmol)を加え、室温で90分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt:ヘキサン:  $\text{Et}_3\text{N}$  = 75:25:1) により精製後、AcOEt-ヘキサンにて再沈澱し、アミダイト体21 (181 mg, 0.25 mmol, 81%)を得た。

【0042】

mp 71-74 °C (AcOEt-ヘキサン).  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  149.6, 149.5, 149.4, 149.3, 149.2.

(2) オリゴヌクレオチド類縁体の一般合成 オリゴマーの合成は Pharmacia社製DNA合成装置 Gene Assembler Plusにより0.2  $\mu\text{mol}$ スケールで行った。溶

収量 0.05  $\mu\text{mol}$  (25% yield)

(4) 5' - GCGTTTXXTGCT - 3' (T3X1T2)

収量 0.03  $\mu\text{mol}$  (15% yield)

(5) 5' - GCGTTTTXGCT - 3' (T5X)

収量 0.06  $\mu\text{mol}$  (30% yield)

(6) 5' - GCGXXTTTGCT - 3' (X2T4)

収量 0.06  $\mu\text{mol}$  (30% yield)

(7) 5' - GCGTXXTGT - 3' (T2X2T2)

収量 0.05  $\mu\text{mol}$  (25% yield)

(8) 5' - GCGTTTTXGCT - 3' (T4X2)

収量 0.06  $\mu\text{mol}$  (30% yield)

(9) 5' - GCGXXXXXXGCT - 3' (X6)

収量 0.06  $\mu\text{mol}$  (30% yield)

(10) 5' - GTTTTTTTXXC - 3' (X2)

収量 0.07  $\mu\text{mol}$  (35% yield)

## 実験例1：融解温度 (Tm) の測定

実験例2で合成した種々のオリゴヌクレオチド類縁体をアンチセンス鎖とし、天然のDNAあるいはRNAからなるセンス鎖とをアニーリング処理したものの融解温度 (Tm値) を測定することにより、本発明のオリゴヌクレオチド類縁体の相補DNAおよびRNAに対するハイブリッド形成能を調べた。

## 【0047】

終濃度をそれぞれ、NaCl 100 mM、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 10 mM、アンチセンス鎖4  $\mu\text{M}$ 、センス鎖4  $\mu\text{M}$ としたサンプル溶液 (500  $\mu\text{L}$ ) を沸騰水中に浴し、10時間をかけてゆっくり室温まで冷却した。分光光度計 (島津 UV-2100PC) のセル室内に結露防止のために窒素気流を通し、サンプル溶液を5°Cまで徐々に冷却し、さらに20分間5°Cに保った後、測定を開始した。サンプル温度は90°Cまで毎分0.2°Cずつ上昇させ、0.1°C間隔で260 nmにおける紫外線吸収を測定した。なお、温度上昇とともにサンプル濃度が変化するのを防ぐため、セルは蓋付きのものを用い、サンプル溶液表面に鉛

(1修飾残基当たり4度)も上昇が認められた。このように、天然鎖よりもTm値がくも上昇する類縁体の例がなく、またDNAよりもRNAに対する親和性が高いことは、本発明のビシクロオリゴヌクレオシド類縁体を構成単位としたオリゴヌクレオチド類縁体がアンチセンス分子として極めて高い性能と医薬品素材としての有用性を有していることを意味していると言える。

## 【0050】

## 実験例2：ヌクレアーゼ酵素耐性の測定

15分間37℃に保ったオリゴヌクレオチドのバッファー溶液(10μM, 400μl)に蛇毒ホスホジエステラーゼのバッファー溶液(0.003U/ml, 400μl)を混合した。混合溶液を37℃に保った石英セル(800μl)に入れ、オリゴヌクレオチドの分解による紫外部吸収(260nm)の増加をSHIMADZU UV-2100PCを用いて経時的に測定した。用いたバッファーの組成はTris-HCl(pH8.6)0.1M, NaCl 0.1M, MgCl<sub>2</sub> 14mMであり測定前に十分に脱気した。

## 【0051】

半減期(t<sub>1/2</sub>)の測定

測定開始時(t=0)及び紫外部吸収が認められなくなった点のUV吸収の平均値を示す時間を半減期(t<sub>1/2</sub>)とした。

## 【0052】

オリゴヌクレオチド配列	t <sub>1/2</sub> (秒)
5'-GTTTTTTTTTTC-3' (天然型)	260
5'-GTTTTTTTTT-XX-C-3' (X 2)	850

また、紫外部吸収の経時変化を示すチャートを図1(天然鎖)及び図2(X2)に示した。天然鎖は酸素反応開始後、約30分で紫外部吸収値が一定となり、X2では約90分で一定となった。

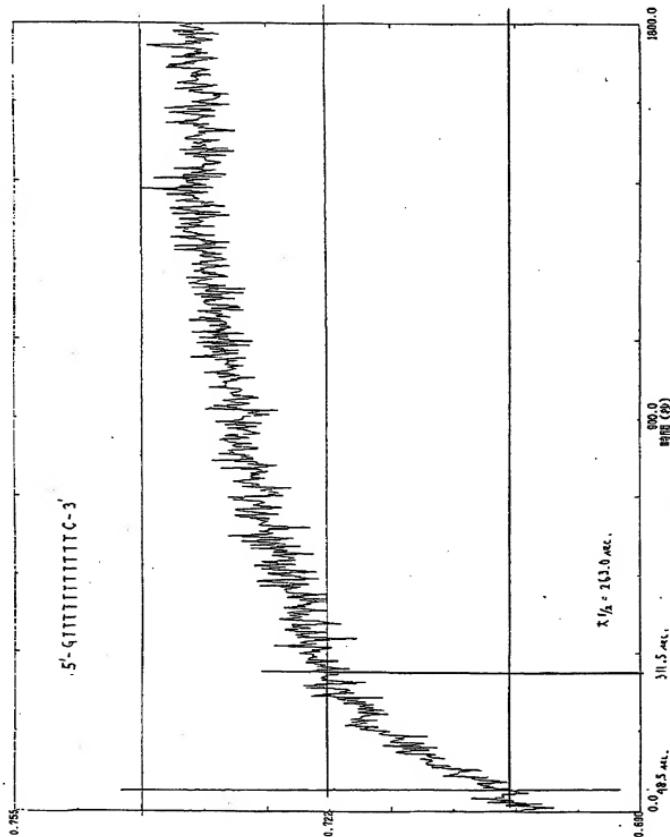
## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

天然型のオリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼで分解した時の紫外部吸収(260nm)の経時変化を示すチャートである。

【書類名】 図面

【図1】



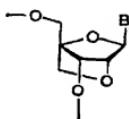
【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 生体内で酵素の加水分解を受けにくく、センス鎖との結合能が高く、しかも合成が容易であるオリゴヌクレオチド類縁体アンチセンス分子を提供する。

【構成】 一般式：

【化1】



(Ia)

[式中、Bはピリミジンもしくはプリン核酸塩基又はそれらの類縁体である]で表される構造を1または2以上有するオリゴまたはポリヌクレオチド類縁体。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [594147039]

1. 変更年月日 1994年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住所 奈良県奈良市千代ヶ丘2丁目2-18  
氏名 今西 武